# 几种杀虫剂对棉铃虫头部酯酶的联合抑制作用

刘贤进，余向阳，高 渊*，董 健
（江苏省农业科学院植物保护研究所，南京 210014）

**摘要**：测定了几种药剂及其组合对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 头部酯酶活性的独立与联合抑制作用。结果显示：久效磷、敌百虫、呋喃丹对酯酶活性抑制中浓度分别为：$2.4443\times10^{-6}$、$3.4562\times10^{-7}$、$2.6302\times10^{-5}$ mol/L。药代动力学分析结果显示：久效磷与呋喃丹对酯酶抑制方式为竞争性抑制，敌百虫为非竞争性抑制。久效磷＋敌百虫与敌百虫＋呋喃丹两种药剂组合处理后，对酯酶抑制均增强，抑制中浓度分别为：$1.0846\times10^{-6}$、$5.1786\times10^{-6}$ mol/L，对酯酶的抑制作用属非竞争性抑制作用。而久效磷＋呋喃丹组合对酯酶抑制活性相加，为竞争性抑制作用。结果说明杀虫剂与酯酶的药代动力学互作对混剂的酯酶的抑制作用方式和活性具有重要影响。

**关键词**：棉铃虫；联合作用；杀虫剂组合；酯酶；药代动力学
**中图分类号**：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）01-0053-05

# Toxicokinetic analysis of joint action of several insecticide-combinations on head esterases

LIU Xian-Jin，YU Xiang-Yang，GAO Yuan，DONG Jian（Institute of Plant Protection，Jiangsu Academy of Agriculture Sciences，Nanjing 210014，China）

**Abstract**: Inhibition and toxicokinetic action of several insecticide-combinations on the esterases from the heads of cotton bollworm（*Helicoverpa armigera* Hübner）were assayed. Residue activity of the esterases assayed *in vitro* showed that the $I_{50}$ values affording 50% inhibition of monocrotophos，trichlorfon and carbofuran were $2.4443\times10^{-6}$，$3.4562\times10^{-7}$ and $2.6302\times10^{-5}$（mol/L）respectively. Graphic analysis on the toxicokinetic mode of action on the enzyme of each insecticide indicated that monocrotophos and carbofuran inhibited the enzyme competitively，while trichlorfon did the same non-competitively. Joint treatment of two insecticides with non-competitive inhibition and competitive inhibition resulted in a potentiated inhibition on the enzyme，and $I_{50}$ values of monocrotophos-trichlorfon and trichlorfon-carbofuran were $1.0846\times10^{-6}$ and $5.1786\times10^{-6}$（mol/L）respectively. On the other hand，joint treatment of two insecticides with competitive inhibition led to a competitive inhibition，but no potentiated joint action. These results suggested that the toxicokinetic interactions between the insecticides and the easterases play an important role in the joint action of the insecticide-combinations on the enzyme.

**Key words**: cotton bollworm；joint action；insecticide-combinations；esterases；toxicokinetics

化学防治是目前控制棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等重大害虫的主要措施，目前，棉铃虫已对多种常用药剂产生抗药性，因此，针对害虫抗药性的主要机制开发具有克服抗药性的药剂联合应用技术是抗性治理的重要研究内容。酯酶在棉铃虫等害虫对有机磷类杀虫剂的抗性中起着重要的作用。在褐稻虱 *Nilaparvata lugens* 和黑尾叶蝉 *Nephotettix bipunctatus* 对氨基甲酸酯和有机磷类杀虫剂的抗药性治理中，曾经成功地利用不同氨基甲酸酯和有机磷类杀虫剂对抗性害虫变构乙酰胆碱酯酶的联合抑制增效作用，开发出对抗性害虫具有良好防治效果的杀虫剂组合，并在日本得到大面积应用（Yamamoto *et al.*，1983）。日本学者的研究还发现，两种乙酰胆碱酯酶抑制剂如马拉硫磷和 DDVP 或对氧磷联合处理时，对乙酰胆碱酯酶的抑制显著增强（Oi *et al.*，1991a，1991b）。本项试验旨在探索几种药剂单剂及其混用组合对棉铃虫头部酯酶抑制活性及作用方式，为分析棉铃虫的抗性机制和为杀虫剂的合理

基金项目：江苏省青年基金项目（97033）和国家回国人员基金资助项目
第一作者简介：刘贤进，博士，研究员，植物保护研究所副所长，主要从事农药毒理与副作用监控研究
＊现工作单位：江苏省张家港市植保植检站
收稿日期 Received：2000-03-28；接受日期 Accepted：2000-10-04

配伍应用提供指导。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试药品

95%久效磷、90%敌百虫、94%呋喃丹均为原药，先以分析纯丙酮配制成 10% 母液作为供试药剂，使用前用磷酸缓冲液（pH 7.4）稀释至所需浓度。

## 1.2 酶源

酶源由室内饲养 6 龄棉铃虫幼虫制得。剪取其头部，每虫加 1 mL 磷酸缓冲液在匀浆器中冰浴研磨，取出上清液，并定容至 2 mL，即得到所需酶源，冰浴保存备用。

## 1.3 生化测定方法

酯酶活性测定参考 Asperen 方法，以 α-乙酸萘酯（α-NA）为底物。抑制中浓度的测定参照高希武等（1989）方法，抑制反应时间为 15 min。样品测定步骤如下：每种抑制剂和底物分别进行剂量梯度实验，并均设空白对照，试验样品在 28 ± 2℃条件下保持 15 min，显色稳定后，在 600 nm 处测定 OD 值。根据测得的 $OD_{600nm}$值由标准曲线转化得到反应所生成的产物 α-萘酚量（mol），求得各抑制剂的抑制中浓度 $IC_{50}$，参照 Sun 等（1960）方法计算对酯酶的联合抑制作用，并以作图法分析抑制剂对酶的抑制反应类型。

# 2 结果

## 2.1 不同药剂对棉铃虫头部酯酶抑制活性比较

几种药剂对酯酶的抑制活性离体测定结果见表 1。药剂抑制酶降解底物活性 50% 的剂量定为 $IC_{50}$ 值。$IC_{50}$越大说明此药剂对酯酶活性抑制越弱，反之则越强。比较所测试药剂的 $IC_{50}$ 值后，可以看出：以下几个供试杀虫剂对棉铃虫头部酯酶活性抑制的强弱顺序为：敌百虫 > 久效磷 > 呋喃丹。

表 1 不同药剂对棉铃虫头部酯酶的抑制作用

**Table 1 Inhibition of several insecticides to esterases from the head of cotton bollworm**

| 药剂 Insecticide | 抑制活力回归曲线 Inhibiting regression line | $\chi^2$ | $IC_{50}$（mol/L） |
|---|---|---|---|
| 久效磷 monocrotophos | $y = 8.1909 + 0.5686x$ | 0.0309 | $2.4443 \times 10^{-6}$ |
| 敌百虫 trichlorfon | $y = 10.4321 + 0.8407x$ | 0.1184 | $3.4562 \times 10^{-7}$ |
| 呋喃丹 carbofuran | $y = 10.0490 + 1.1024x$ | 0.2307 | $2.6302 \times 10^{-5}$ |

## 2.2 不同药剂组合对棉铃虫头部酯酶抑制活性的比较

参照孙云沛单剂和混剂杀虫剂对昆虫致死中浓度测定方法和混剂增强测定方法，杀虫剂单剂和杀虫剂联合处理组合对酯酶的抑制 $IC_{50}$法进行共毒系数分析。

**2.2.1** 久效磷和敌百虫对棉铃虫头部酯酶的联合抑制作用：从测定结果可以看出，久效磷和敌百虫参照对酯酶等毒剂量（32:5）联合处理后，对酯酶抑制活性的共毒系数为 123.8（表 2），大于 120。表明该组合对棉铃虫头部酯酶活性抑制呈增效作用。

**2.2.2** 敌百虫和呋喃丹对棉铃虫头部酯酶的联合抑制作用：敌百虫和呋喃丹（2:47）组合对棉铃虫酯酶的联合抑制作用同上方法测定，敌百虫和呋喃丹药剂组合对棉铃虫头部酯酶的抑制活性结果见表 3。从表 3 可以看出，该组合对酯酶的联合抑制作用的共毒系数达 124.9，大于 120。表明该组合对棉铃虫头部酯酶活性抑制呈增效作用。

**2.2.3** 久效磷和呋喃丹对棉铃虫头部酯酶的联合抑制作用：久效磷和呋喃丹（4:47）组合对棉铃虫头部酯酶的抑制活性离体测定结果见表 4。可以看出，该组合对酯酶抑制作用的共毒系数为 96.1，与前面组合的趋势明显不同。显示此组合对棉铃虫头部酯酶活性抑制呈相加作用，没有明显增效互作。

表 2 久效磷和敌百虫（32:5）对酯酶的联合抑制作用

**Table 2 Joint inhibition of monocrotophos and trichlorfon to esterases from the head of cotton bollworm**

| 药剂 Insecticide | 抑制活力回归线 Inhibiting regression line | $\chi^2$ | $IC_{50}$（mol/L） | 共毒系数 CTC |
|---|---|---|---|---|
| 久效磷 monocrotophos（M） | $y = 8.1909 + 0.5686x$ | 0.0309 | $2.4443 \times 10^{-6}$ | |
| 敌百虫 trichlorfon（T） | $y = 10.4321 + 0.8407x$ | 0.1184 | $3.4562 \times 10^{-7}$ | |
| 久 + 敌 M + T | $y = 8.8717 + 0.6491x$ | 0.0005 | $1.0846 \times 10^{-6}$ | 123.8 |

**表 3　敌百虫和呋喃丹（2∶47）组合对酯酶的联合抑制作用**

**Table 3　Joint inhibition of trichlorfon and carbofuran to esterases from the head of cotton bollworm**

| 药剂 Insecticide | 抑制活力回归线 Inhibiting regression line | $\chi^2$ | $IC_{50}$（mol/L） | 共毒系数 CTC |
|---|---|---|---|---|
| 呋喃丹 carbofuran（C） | $y = 10.0490 + 1.1024x$ | 0.2307 | $2.6302 \times 10^{-5}$ | |
| 敌百虫 trichlorfon（T） | $y = 10.4321 + 0.8407x$ | 0.1184 | $3.4562 \times 10^{-7}$ | |
| 敌 + 呋 C + T | $y = 9.3280 + 0.8188x$ | 0.0553 | $5.1786 \times 10^{-6}$ | 124.9 |

**表 4　久效磷和呋喃丹（4∶47）组合对酯酶的联合抑制作用**

**Table 4　Joint inhibition of monocrotophos and carbofuran to esterases from the head of cotton bollworm**

| 药剂 Insecticide | 抑制活力回归线 Inhibiting regression line | $\chi^2$ | $IC_{50}$（mol/L） | 共毒系数 CTC |
|---|---|---|---|---|
| 久效磷 monocrotophos（M） | $y = 8.1909 + 0.5686x$ | 0.0309 | $2.4443 \times 10^{-6}$ | |
| 呋喃丹 carbofuran（C） | $y = 10.0490 + 1.1024x$ | 0.2307 | $2.6302 \times 10^{-5}$ | |
| 久 + 呋 M + C | $y = 8.1194 + 0.6486x$ | 0.1705 | $1.5508 \times 10^{-5}$ | 96.1 |

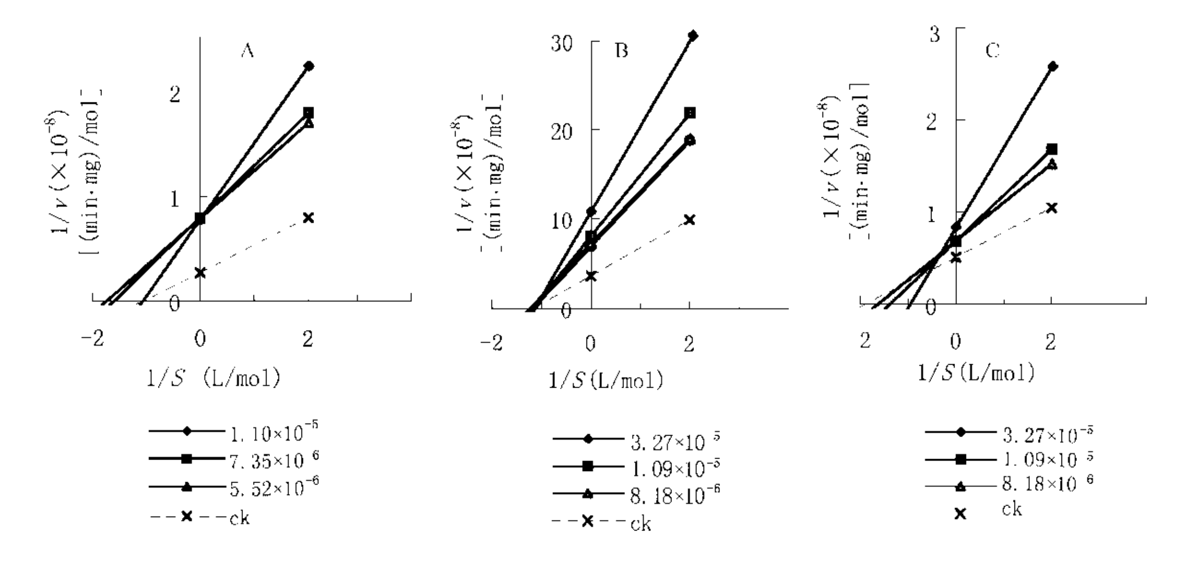



图 1　3 种药剂对棉铃虫头部酯酶活性的抑制曲线

Fig. 1　Inhibiting curves of three insecticides to esterases from the head of cotton bollworm

A. 久效磷 monocrotophos；B. 敌百虫 trichlorfon；C. 呋喃丹 carbofuran

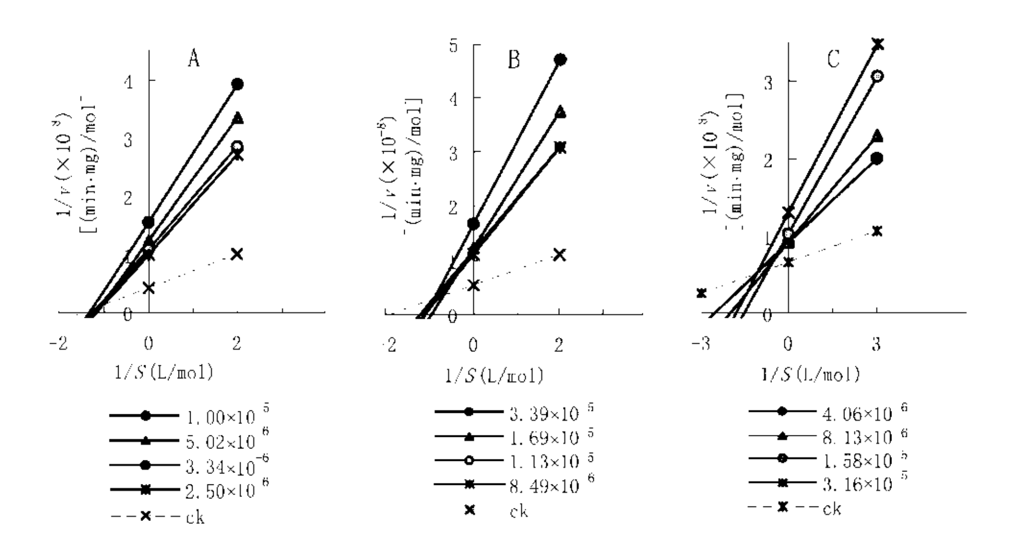



图 2　3 种药剂组合对棉铃虫头部酯酶活性的抑制曲线

Fig. 2　Inhibiting curves of three insecticide-combinations to esterases from the head of cotton bollworm

A. 久效磷:敌百虫 monocrotophos:trichlorfon（32:5）；B. 敌百虫:呋喃丹 trichlorfon:carbofuran（2:47）；
C. 久效磷:呋喃丹 monocrotophos:carbofuran（4:47）

### 2.3 不同药剂对棉铃虫头部酯酶的抑制作用方式分析

**2.3.1** 单剂对酯酶抑制作用方式的比较：根据不同酶和底物浓度梯度试验的结果，求得酯酶在不同抑制剂浓度作用下，不同底物浓度的反应速度 $v$ [mol/（min·mg）]。以 $1/v$ [（min·mg）/mol] 为纵坐标，$1/S$（L/mol）为横坐标作图，分析3种杀虫剂对棉铃虫头部酯酶的抑制作用方式，结果如图1。最大反应速度 $V_{max}$ 为曲线与 $1/v$ 轴的交点的纵坐标值的倒数，酯酶米氏常数 $K_m$ 值为曲线与 $1/S$ 轴的交点的横坐标值的负倒数。可以看出，久效磷对棉铃虫头部酯酶的抑制方式为竞争性抑制。久效磷浓度由 $5.52 \times 10^{6}$ mol/L 至 $1.10 \times 10^{5}$ mol/L 逐步升高，$K_m$ 值由 $5.838 \times 10^{5}$ mol/L 升为 $9.610 \times 10^{5}$ mol/L，而 $V_{max}$ 仅在 $1.259 \times 10^{8} \sim 1.297 \times 10^{8}$ mol/（min·mg）之间变动，$K_m$ 值的变化明显比 $V_{max}$ 的变化显著（图1：B）。敌百虫对棉铃虫头部酯酶的抑制方式为非竞争性抑制。敌百虫浓度由 $2.99 \times 10^{7}$ mol/L 至 $1.20 \times 10^{6}$ mol/L 逐步升高，$K_m$ 值仅在 $8.255 \times 10^{5} \sim 8.959 \times 10^{5}$ mol/L 之间变化，而 $V_{max}$ 则由 $1.459 \times 10^{8}$ 降为 $0.929 \times 10^{8}$ mol/（min·mg），$V_{max}$ 的变化明显比 $K_m$ 值的变化显著（图1：B）。呋喃丹对棉铃虫头部酯酶的抑制方式为竞争性抑制。呋喃丹浓度于 $8.8 \times 10^{6}$ mol/L 至 $3.27 \times 10^{5}$ mol/L 逐步升高，$K_m$ 值由 $6.226 \times 10^{5}$ mol/L 升为 $10.602 \times 10^{5}$ mol/L，而 $V_{max}$ 仅在 $1.205 \times 10^{8} \sim 1.468 \times 10^{8}$ mol/（min·mg）之间变化，$K_m$ 值的变化比 $V_{max}$ 的变化明显（图1：C）。

**2.3.2** 几种杀虫剂组合对酯酶抑制作用方式的分析：以各杀虫剂单剂对酯酶抑制活性近等的原则进行不同杀虫剂之间的组合，并对该组合对酯酶的抑制作用方式进行测定。图2中列出了各组合对棉铃虫头部酯酶的抑制作用方式类型。久效磷+敌百虫组合和呋喃丹+敌百虫组合对酯酶的抑制作用方式属非竞争性抑制。而久效磷+呋喃丹组合则为竞争性抑制。

## 3 讨论

酯酶对杀虫剂的作用是双向的。一方面杀虫剂对酯酶活性有抑制，这方面研究正越来越受到关注，已有报道表明一些杀虫剂通过和酯酶不可逆结合，从而抑制其活性（Ownsu *et al.*，1996a，1996b）。另一方面酯酶可以对杀虫剂进行代谢。针对不同的杀虫剂，这种相互作用的方式表现出明显差异。久效磷和呋喃丹对棉铃虫头部酯酶抑制作用方式为竞争性抑制，敌百虫为非竞争性抑制。敌百虫分别与呋喃丹、久效磷组合结果均为增效。这一结果进一步验证敌百虫对酯酶的抑制活性更强；也说明不同类型杀虫剂对酯酶的抑制，可能发生在酯酶的不同同工酶或酶分子的不同作用位点上。这种酯酶的多活性位点或多种分子（或酯簇）的特点，为多种药剂的联合抑制提供了前提。这一结果显示在实际进行杀虫剂联合应用时，通过使用的药剂组合可以达到减轻降解作用，提高防效的目的。但也不排除这种结合位点之间相互关系会导致一种药剂的结合会阻碍另一种药剂结合过程。

通过试验发现3种药剂对酯酶均具有抑制活性，其抑制活力差异较大。这主要可能与药剂和酯酶形成共价键的能力有关。而药剂对酯酶的抑制方式的差异则表明不同药剂在与 α-乙酸萘酯竞争与酯酶的结合位点能力的差异。药剂联合处理后，抑制作用方式则变得较为复杂，其结果可以分析为两种单剂方式的总和，是一种趋势。具有相同抑制方式的药剂组合后，可以得出较一致的抑制方式，而不同抑制作用方式中，则多为竞争性抑制方式。如敌百虫+呋喃丹联合处理作用方式为偏向于非竞争性抑制；久效磷+呋喃丹和久效磷+敌百虫，两种联合处理作用方式均趋向竞争性抑制。这些结果是在单剂以相近或相等抑制活力情况下，获得的联合抑制作用。根据 Oi 等（1991a，1991b）的分析，当两种杀虫剂的比例越接近各种单剂对靶标酶的抑制中浓度时，则联合抑制的增效作用最大，因而，这些结果也是比较典型的联合抑制作用结果和方式。而不同配比条件下联合作用方式的变化将可能更为复杂，这方面工作尚有待进一步研究。

## 参 考 文 献 （References）

Gao X W，Zheng B Z，Liang T T *et al.*，1989. Synergism and synerdistic mechanism of organophosphorous insecticides and synergists to organophosphorous and pyrethroid insecticides in melon-cotton aphid. *Acta Phytophylacica Sinica*，16（4）：273～276. [高希武，郑炳宗，梁同庭等，1989. 杀虫剂混剂或加增效剂对瓜-棉蚜增效作用及机制的研究. 植物保护学报，16（4）：273～276]

Oi M，Motoyama N，1991a. A theoretical analysis of the joint action of insecticides by toxicokinetic approaches. *J. J. Pestici. Sci.*，16（3）：465～473.

Oi M，Motoyama N，1991b. *In vitro* studies on joint action of insecticides. *J. J. Pestici. Sci.*，16（4）：475～480.

Ownsu E O *et al.*，1996a. Polyacrylamide gel electrophoretic assessment of esterases in cotton aphid（Homoptera：Aphididae）. *J. Econ. Entomol.*，89（2）：302～306.

Ownsu E O *et al.*，1996b. Inhibition by insecticides of partially purified carboxyl -esterau from *Aphis gossypii*（Homoptera：Aphididae）. *J. Econ. Entomol.*，89（2）：307～310.

Sun Y P，Johnson E R，1960. Analysis of joint action of insecticides against house flies. *J. Econ. Entomol.*，53：87～91.

Yamamoto I，Takahashi Y，Kyomura B，1983. Suppression of altered acetylcholinesterase of the green rice leafhopper by n-propyl and n-methyl carbamate combinations. In：Georghiou G P，Saito T eds. Pest Resistance to Pesticides. New York：Plenum Press. 595～614.